

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22096</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07606</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1999 (11.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 47 422.9 14. Oktober 1998 (14.10.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Leo-Brandt-Str., D-52425 Jülich (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EISENKRÄTZER, Detlef [DE/DE]; Münchener Str. 5, D-52428 Jülich (DE). DINTER, Andre [CH/CH]; Lindenstr. 459, CH-5628 Birri (CH). KIESEWETER, Andre [DE/DE]; Albert-Schweitzer-Str. 13, D-98528 Suhl (DE). ZENG, Steffen [DE/DE]; Kapellersgutweg 28, D-78462 Konstanz (DE). BISELLI, Manfred [DE/DE]; Max-Hermkes-Platz 8, D-52428 Jülich (DE). BERGER, Eric, G. [CH/CH]; Zum Mühlweiher 4, CH-8165 Schöfflisdorf (CH).</p> <p>(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Str. 10, D-40878 Ratingen (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: CHINESE HAMSTER OVARY CELLS FOR PRODUCING PROTEINS</p> <p>(54) Bezeichnung: CHINESE-HAMSTER-OVARY-ZELLEN ZUR PRODUKTION VON PROTEINEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to Chinese hamster ovary cells for producing proteins which are characterized in that the growth phase and production phase thereof are separated from one another. The invention also relates to a method for producing the Chinese hamster ovary cells, and to the use of the Chinese hamster ovary cells for producing proteins.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen, die sich dadurch auszeichnen, daß deren Wachstums- und Produktionsphase voneinander entkoppelt sind. Ferner sind Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sowie die Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Herstellung von Proteinen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen, ein Verfahren zur Herstellung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sowie die Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Herstellung von Proteinen, vorzugsweise Enzymen.

10 Der Einsatz von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen ist aus dem Stand der Technik bekannt. Beispielhaft sei hierzu auf Koplove H.M., Ann Hematol 1994; 68(3):15-20 verwiesen. Bei diesen Verfahren werden die Zellen in herkömmlichen Rührfermentern eingesetzt. Eine Verwendung in immobilisierter Form ist bekannt (Zeng S.
15 et al, Biochem Biophys Res Commun 1997; 237 (3):653-658). Jedoch besteht ein Bedarf zur Verbesserung der Ausbeute an spezifischen Proteinen in immobilisierten Zellen.

Die vorliegende Erfindung hat sich demgemäß die Aufgabe gestellt,
20 Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen zur Verfügung zu stellen, die in immobilisierter Form für den Einsatz im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die Wachstums- und
25 Produktionsphase der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen voneinander entkoppelt sind.

Erfindungsgemäß zeichnen sich die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen vorzugsweise dadurch aus, daß die maximale Sekretion der spezifischen
30 Produkte in der G1-Phase erfolgt. G1 bedeutet, daß die Zelle in dieser Phase des Zellzyklus den einfachen Gehalt an Desoxyribonukleinsäuren

(DNA) besitzt. Ferner sind die Zellen vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß mit abnehmender Wachstumsrate die Produktbildungsrate zunimmt, so daß bei minimaler Wachstumsrate eine maximale Produktbildungsrate vorliegt. Erfindungsgemäß ist die

5 zellspezifische Produktbildungsrate bei minimaler Wachstumsgeschwindigkeit mindestens genauso hoch wie die spezifische Produktbildungsrate herkömmlich transfizierter Zellen bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit. Besonders bevorzugt ist ein Anstieg der Produktbildungsrate um mindestens 50% bei einem Rückgang des

10 Wertes für das S/G1-Verhältnis um mindestens 50% vom Maximalwert. D.h., daß die Abnahme der spezifischen Wachstumsrate umgekehrt proportional zur Zunahme der zellspezifischen Produktbildungsrate ist. Mit S wird in diesem Zusammenhang die Phase im Zellzyklus bezeichnet, in der die Verdopplung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)

15 erfolgt, bevor die eigentliche Zellteilung durchgeführt wird.

Die erfindungsgemäßen Chinese-Hamster-Ovary-Zellen lassen sich dadurch herstellen, daß

- a) ein Inoculum hoher Zelldichte hergestellt wird,
- 20 b) die Zellen mindestens 24 h konfluent anwachsen und
- c) nach Bildung einer konfluenten Oberfläche eine Übertragung genetischen Materials in diese Zellen durchgeführt wird.

Vorzugsweise kann erfindungsgemäß ein Inoculum mit einer Zelldichte

25 von mindestens 1×10^5 Zellen/cm² hergestellt werden. Besonders bevorzugt sind Zelldichten von 1×10^5 bis 4×10^5 Zellen/cm². Höchst bevorzugt sind Zelldichten von 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen/cm².

Eine Kultur adhärent wachsender Zellen wird dabei als konfluent

30 bezeichnet, wenn zwischen den einzelnen, an eine Oberfläche angehefteten Zellen keine freie, unbesiedelte Oberfläche mehr vorhanden

ist und die Zellen eine geschlossene Schicht auf der Oberfläche ausgebildet haben. Vorzugsweise wachsen die Zellen 24 bis 72 h konfluent an. Besonders bevorzugt sind hierbei Zeiten von 30 bis 60 h. Höchst bevorzugt sind 40 bis 50 h.

5

Erfindungswesentlich ist, daß die Übertragung genetischen Materials erfolgt, nachdem sich eine geschlossene, konfluente Fläche aus Zellen auf der Oberfläche des Trägers gebildet hat, sich die Zellen somit in einem Status der G1-Phase des Zellzyklus befinden. Im Gegensatz dazu erfolgt
10 bei den bisher bekannten Verfahren die Übertragung genetischen Materials in Zellen, die sich in einem Status der S-Phase des Zellzyklus befinden, üblicherweise nachdem sie subkonfluent angewachsen sind.

Die erfindungsgemäßen Wirkungen lassen sich überraschender Weise
15 auch bei Einsatz der erfindungsgemäßen Zellen in Wirbelschichtreaktoren und trotz der dort auftretenden hohen Scherkräfte erreichen. Wesentlich ist hier, daß die Übertragung des genetischen Materials durchgeführt wird, nachdem die Zellen durch die Immobilisierung auf porösem Trägermaterial in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert wurden.

20

Die Übertragung des genetischen Materials kann in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Transformation oder Elektroporation durchgeführt werden. Besonders bevorzugt ist die Übertragung genetischen Materials durch eine Transfektion der Zellen.

25

Im Anschluß an die Übertragung genetischen Materials erfolgt die Auswahl der geeigneten Klone. D.h. in an sich bekannter Weise wird ein Screening durchgeführt, um die optimalen Zellen zu ermitteln und zu züchten. Beispielsweise durch eine Sortierung einzelner, vitaler Zellen in
30 eine Kammer einer Gewebekulturplatte mit Hilfe eines Flowzytometers, anschließender Überprüfung der Produktivität der einzelnen Klone in

einem ELISA-Test und Selektion der besten Klone durch funktionelle Enzymtests.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, das Maximum der
5 Expression rekombinanter Genprodukte in die G1-Phase zu verschieben.
Im Gegensatz dazu führen herkömmliche Transfektionsverfahren zu einer
Expression rekombinanter Proteine in der S-Phase des Zellzyklus.
Derartige Zellen weisen bei der Immobilisierung eine stark verminderte
Produktivität auf. Hingegen zeichnen sich die erfindungsgemäßen Zellen
10 durch eine demgegenüber wesentlich höhere Produktivität aus.
Insbesondere wird überraschend erreicht, daß das Strukturgemisch eine nicht
vorhersehbare Stabilität aufweist, wodurch die erfindungsgemäß
hergestellten Zellen zur Produktion im großtechnischen Maßstab geeignet
sind.

15 Erfindungsgemäß lassen sich demgemäß die Zellen in immobilisierter
Form in Wirbelschichtreaktoren einsetzen. Insbesondere sind die Zellen
zur Herstellung von verschiedenen Proteinen, vorzugsweise von Enzymen
geeignet. Ganz besonders können sie zur Herstellung von
20 Glykosyltransferasen verwendet werden.

Im folgenden wird die Anmeldung unter Bezugnahme auf die Beispiele
näher erläutert:

25 1. Klassisches Transfektionsverfahren zur Übertragung genetischen
Materials:

Bei dem klassischen Transfektionsverfahren wird die Stammlinie
Chinese-Hamster-Ovary-K1, ATTC#CLR-9618 zu $0,3 \times 10^6$ Zellen pro
3,5 cm² in Rundschaalen in HAM's F12-Medium der Firma GibcoBRL Life
30 Technologies, Gaithersburg, bei 37°C in einem CO₂-Brutschrank
kultiviert. Nach 24 Stunden sind die Zellen subkonfluent angewachsen.

Zur Transfektion werden die Zellen einmal in 2 ml Serum-freiem Medium HAM's F12 der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, gewaschen und anschließend mit einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen pro 35-mm Gewebekulturplatte in 0,8 ml Serum-freiem Medium HAM's F12 überführt. In sterilen Reaktionsgefäßen werden in je 100 µl Serum-freiem Medium 10µl Lipofectamin-Reagenz der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, bzw. 3 µg rekombinante Plasmid-DNA (pProtA/sol-FTIII, s. Ergänzungen), die für eine Glykosyl-Transferase kodiert sowie 1 µg Plasmid-DNA (pSV2neo) der Firma Clontech, Palo Alto, USA, die als Selektionsmarker für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin kodiert gelöst. Beide Lösungen werden zusammengegeben, sanft gemischt und zur Ausbildung der DNA-Liposom-Komplexe bei Raumtemperatur 15 bis 45 Minuten inkubiert. Anschließend werden diese DNA-Liposom-Komplexe in die Zellsuspension überführt und sanft gemischt. Nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C in einem CO₂ Brutschrank werden die Zellen mit 1 ml Medium HAM's F12 mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, überschichtet. Nach 24 Stunden erfolgt ein Austausch des Mediums gegen 1 ml HAM's F12 mit 10 % FCS und 800 µg/ml_{Medium} G418 (= Geneticin der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg) zum Start der Selektion. Dieses Medium wird alle 48 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Ab dem 6. Tag nach der Transfektion wird das zuletzt genannte Medium alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Am 12. Tag sind einzelne Klone auf der Gewebekulturplatte sichtbar, die einzeln mit einer Gilson®-Pipette abgenommen und separat in dem zuletzt genannten Medium kultiviert werden, welches alle 24 Stunden gegen frisches Medium mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird. Ab dem 18. Tag nach der Transfektion wird dieses Medium alle 48 Stunden gegen

frisches Medium ausgetauscht. Am 22. Tag nach der Transfektion erfolgt ein funktioneller Enzymtest zur Überprüfung der Produktivität der einzelnen Klone. Das genaue Versuchsprotokoll wird unter Punkt 3 genauer erläutert.

5

2. Erfindungsgemäßes Verfahren zur Übertragung genetischen

Materials:

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden aus der Stammsammlung ATCC#CLR-9618 Chinese-Hamster-Ovary-K1-Zellen zu $0,6 \times 10^6$ Zellen pro $3,5 \text{ cm}^2$ in Rundschalen in HAM's F12-Medium der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank kultiviert. Nach 48 Stunden sind die Zellen konfluent angewachsen. In sterilen Reaktionsgefäßen werden in je 100 μl Serum-freiem Medium HAM's F12 der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, 10 μl Lipofectamin-Reagenz der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg verdünnt, sowie 3 μg rekombinante Plasmid-DNA (pProtA/sol-FTIII, s. Ergänzungen), die für eine Glykosyl-Transferase kodiert und 1 μg Plasmid-DNA (pSV2neo) der Firma Clontech, Palo Alto, USA, die als Selektionsmarker für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin kodiert gelöst. Anschließend werden beide Lösungen zur Ausbildung von DNA-Liposom-Komplexen vereinigt, sanft gemischt und 15 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wird das Kulturmedium aus der Rundschale entfernt, ohne jedoch die Zellen von der Oberfläche abzulösen.
- Anschließend wird die DNA-Liposomen-Suspension über die adhärenenten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank werden die Zellen zusätzlich mit 1 ml Medium HAM's F12 mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, überschichtet. Nach 6 Tagen erfolgt ein Austausch des Mediums gegen 1 ml HAM's F12 mit 10 / FCS und 800

30

- $\mu\text{g/ml}_{\text{Medium}}$ G418 (= Geneticin der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg) zum Start der Selektion. Dieses Medium wird alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Ab dem 15. Tag nach der Übertragung des genetischen
- 5 Materials in die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sind einzelne Klone auf der Gewebekulturplatte sichtbar. Mit 1 ml einer gebrauchsfertigen Trypsin/EDTA (Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, werden alle angewachsenen Klone abgeschwemmt und in je einer Rundschale mit je 1 ml Medium
- 10 HAM's F12 mit 10 % FCS und $800 \mu\text{g/ml}_{\text{Medium}}$ G418 erneut kultiviert. Nach 3 Tagen werden die vitalen Zellen nach dem sogenannten Single-Cell-Sorting im Streulicht eines Flowzytometers (z.B. FACScan® der Firma Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) vereinzelt. Je eine Zelle wird in eine Kammer einer Gewebekulturplatte mit 96
- 15 Vertiefungen sortiert und anschließend in HAM's F12-Medium mit 10 % FCS und $800 \mu\text{g/ml}_{\text{Medium}}$ G418 kultiviert, wobei das Medium alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird. Nach weiteren 3 Tagen wird das Medium alle 48 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung
- 20 ausgetauscht. Am 23. Tag nach Übertragung des genetischen Materials in die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen wird zur Überprüfung der Produktivität und Auswahl der besten Klone ein Enzym-gekoppelter immunologischer Test (ELISA; Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) durchgeführt, der ausführlich bei Zeng S. et al, Biochem Biophys Res
- 25 Commun, 1997, Aug 28; 237(3):653-658 beschrieben wird. Im Anschluß daran werden die so selektierten Klone zur Überprüfung ihrer Produktivität einem funktionellen Enzymtest (s. Punkt 3) unterzogen.

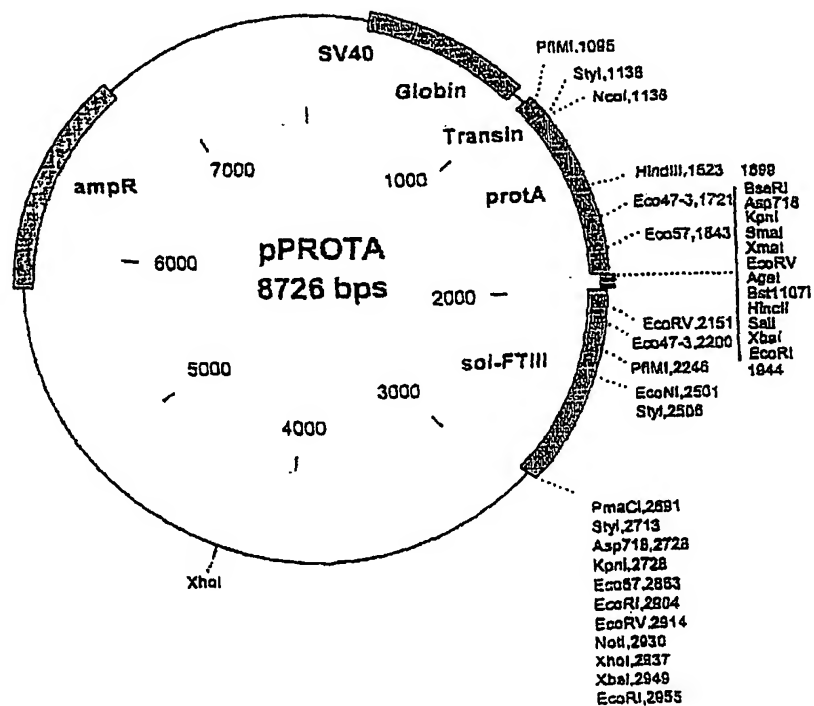
Erklärungen zu 1) und 2):

- Eine detaillierte Karte des verwendeten Vektors pProtA/sol-FTIII, der für die humane Alpha-1,3-Fukosyltransferase ohne Membrananker kodiert, ist nachfolgend dargestellt. Von dem vorliegenden Strukturgen der Fukosyltransferase-III (Vestweber D., Zentrum für Molekularbiologie der
- 5 Entzündung, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, BRD) wurde die transmembrane Domäne abgetrennt und die lösliche Form mit den Aminosäuren 44-361 (accession#X53578) in den Vektor pProtA integriert.

Karte des verwendeten Vektors pProtA/sol-FTIII

- 5
- AmpR: Ampicillinresistenz für die Produktion der DNA in E.coli
 - SV40: Transkriptionspromotor vom SV40-Virus
 - Globin: kodierende Region für Globin
 - Transin: kodierende Region für Transin als Signalsequenz für die Ausschleusung der Transferase
- 10
- Sol-FTIII: Strukturgen der Fukosyltransferase III ohne Membrananker
 - ProtA: kodierende Region für das Protein A zur erleichterten Aufarbeitung

Literatur: Sanchez-Lopez R. et al, JBC 1998, 263(24):11892-11899



3. Funktioneller Enzymtest zur Bestimmung der Transferase-Aktivität:

Das Prinzip des Nachweises der Transferase-Aktivität beruht darauf, daß radioaktiv markierte Fukose in einer Enzym-katalysierten Reaktion von GDP-Fukose auf den Akzeptor N-Acetyl-Lactosamin (LacNAc, Sigma-
5 Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) übertragen wird. Der freie Akzeptor und das nicht umgesetzte Substrat werden über eine Chromatographie-Säule von dem radioaktiven Produkt getrennt und diese Radioaktivität als Maß für die vorhandene Enzymmenge gemessen.

Zunächst wird das Enzym durch Bindung an IgG-Sepharose
10 angereichert. Dazu werden 1,5 ml des zellfreien Überstandes mit 40 µl Trägermaterial bestehend aus 50% IgG-Sepharose-Kugeln in 0,05% Tween 20/5 mM Tris-HCl pH 7.6 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Trägerkugeln werden diese direkt und quantitativ in den Enzymtest eingesetzt. Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 80
15 µl beinhaltet neben diesen 40 µl des 50%igen IgG-Sepharose-Trägermaterials zusätzlich 40 µl Reaktionsansatz bestehend aus 40mM Cacodylate-Puffer pH 6,2, 5 mM LacNAc als Akzeptor, 0,1 mM GDP-Fucose als Donor, 1 µl ¹⁴C-GDP-Fucose (50.000 cpm), 10 mM MnCl₂, 5 mM ATP und 10 mM Fucose. Der Testansatz wird unter leichtem
20 Schütteln für 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert und liefert einen Gehalt an eingebauter Radioaktivität zwischen 1000 und 10000 cpm. Der Ansatz wird durch die Zugabe von kaltem Wasser gestoppt, über SepPak-Patronen (Firma Waters) aufgereinigt und anschließend zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt. Die Enzymaktivität berechnet
25 sich dabei wie folgt: Enzymaktivität[U/l] = (Radioaktivität des Produkts [cpm] / insgesamt eingesetzte Radioaktivität [cpm]) x (Substratmenge [µmol] / Inkubationszeit [min] / Volumen an eingesetztem Kulturüberstand [1,5 ml]).

4. Bestimmung der Produktbildungskinetik in Suspensionskultur:

Als Voraussetzung zur Bestimmung der Produktbildungskinetik der Zellen wird eine Stammhaltung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in T75-Gewebskulturflaschen (Greiner; Frickhausen, BRD) betrieben. Aus dieser Stammhaltung werden dann $2-3 \times 10^7$ lebende Zellen als Inoculum

5 entnommen. Zunächst wird dazu das alte Kulturmedium abgenommen und in jede T-Flasche 2,5 ml Trypsin-EDTA der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, gefüllt, umgeschwenkt und nach 1 Minute wieder aus der Flasche abgenommen. Die T-Flaschen werden für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, die Zellen anschließend abgeklopft

10 und mit 5 ml bei 37°C vorgewärmtem Medium aus einer 3:1-Mischung von DMEM-HAM's F12 mit Supplementen (GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg) von der Flaschenwand abgespült. Mit 0,1 ml Zellsuspension wird aus jeder Flasche die Zelldichte bestimmt. Nach Berechnung der Zellkonzentration wird das entsprechende Volumen mit

15 $2-3 \times 10^7$ Zellen entnommen, in eine sterile Spinner-Flasche (Techne; Cambridge, GB) überführt und auf 100 ml aufgefüllt. Dies entspricht einer Startzellkonzentration von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen werden in einer 3:1-Mischung aus DMEM und HAM's F12, beide mit einer Osmolarität von 350 mOsmol/kg, kultiviert. Außerdem enthält das Medium als

20 Supplemente essentielle Aminosäuren, Spurenelemente, Vitamine, 6 mg/l Insulin, 6 mg/l Transferrin, 0,1952 mg/l Linolsäure, 0,04636 mg/l Thiolsäure und 1% (v/v) Fötales Kälberserum sowie 5 mmol/l Glutamine und 24 mmol/l Glukose. Die Spinner-Flaschen werden auf einer Rührerplatte bei 60 Upm, einem CO_2 -Gehalt von 5% und 37°C inkubiert.

25 Mindestens alle 24 Stunden wird eine Probe von 10 ml steril aus der Spinner-Flasche entnommen und die Zellen bei 200 g in 10 Minuten abzentrifugiert. Die Produktkonzentration wird im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Das Zellpellet wird in 2 ml frischem und vorinkubiertem Medium (5% CO_2 , 37°C) resuspendiert, in ein Falcon-

30 Kulturröhrchen (Greiner; Frickenhausen, BRD) überführt und für 2

Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten bei 200 g abzentrifugiert und die Produktkonzentration im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Berechnung der zellspezifischen Produktivität erfolgt nach der Gleichung:

5

Produktivität =

10

$$\frac{\text{Gesamtmenge an sekretiertem Produkt}}{\text{Inkubationszeit} \times \text{Gesamtzellzahl während der Inkubation}}$$

15

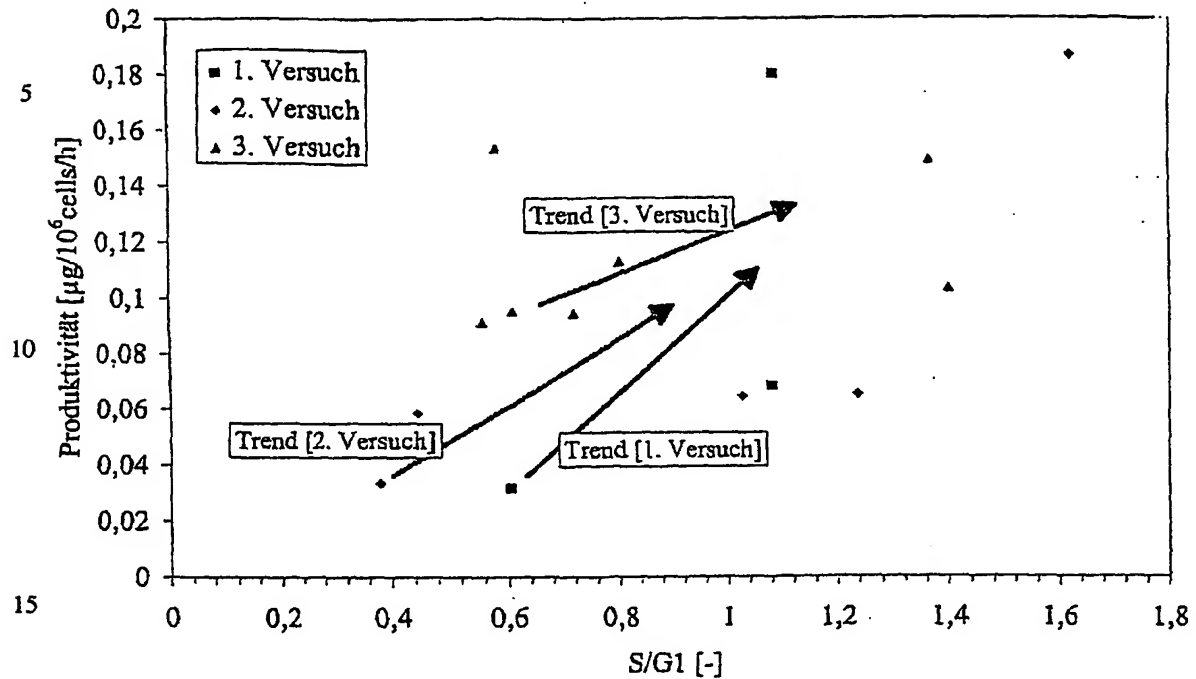
Die Zellzyklusverteilung wird mittels Flowzytometer bestimmt. Dazu werden die Zellen in 70 %igem Alkohol resuspendiert und zur Permeabilisierung der Zellmembran über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und 1×10^6 Zellen in PBS-Puffer der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, der zusätzlich 400 U/ml RNase (Sigma; Deisenhofen, FRG) und 50 µg/ml Popidiumjodid (Sigma; Deisenhofen, FRG) enthält, resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln werden die Zellen direkt mittels eines FACScan®-

20

Flowcytometers der Firma Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA gemessen. Als Analyse-Programm wurde das Programm Cell-Quest (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) angewendet. Zur Ermittlung der Zellzyklusphasen werden die erhaltenen Histogramme mathematisch mit dem Programm ModFit® (Becton

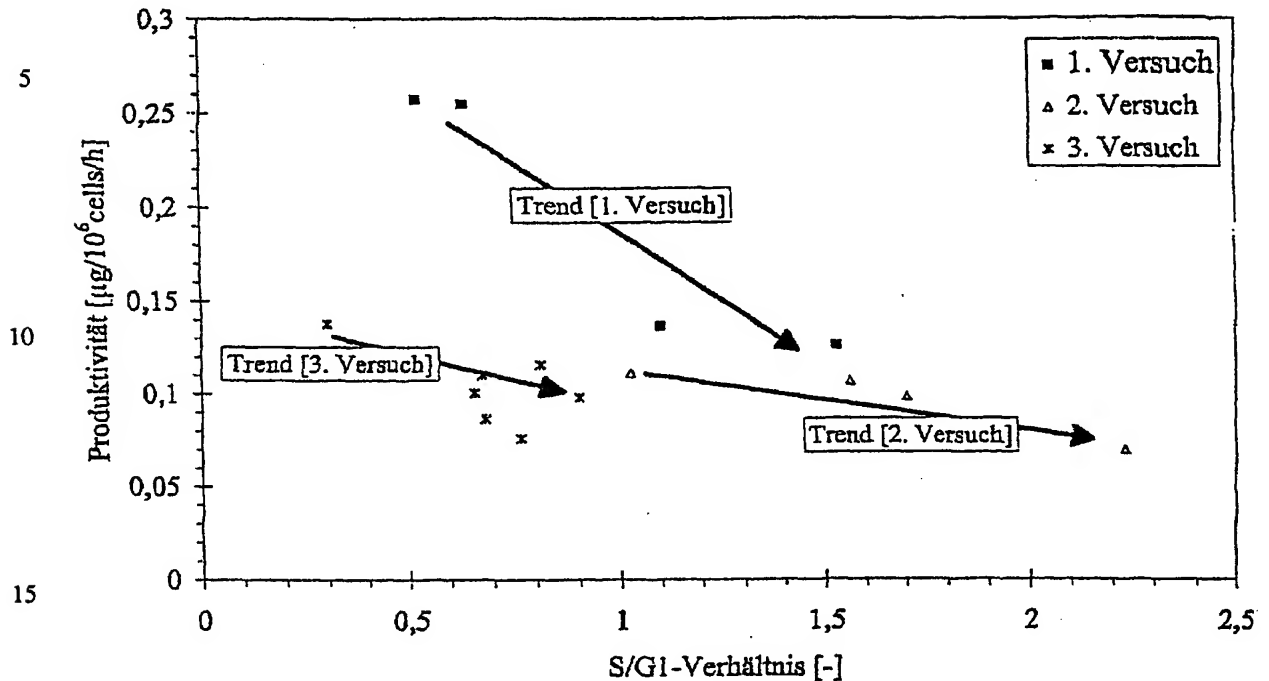
25

Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) ausgewertet.

5a. Ergebnisse der Standard-Methode:

20

In der obigen Abbildung ist für drei Experimente in Suspensionskultur die Produktsekretion in Abhängigkeit von der Proliferation der Zellen dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß bei der Standard-
 25 Transfektionsmethode die Produktsekretion mit der Proliferation der Zellen zunimmt. Während der Phase starken Wachstums liegt eine erhöhte Produktsekretion vor.

5b. Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Die Charakterisierung der Produktbildung von Zellen, bei denen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren genetisches Material übertragen wurde, ergab eine gegenläufige Tendenz. Mit zunehmender Proliferation sank in allen Versuchen die Produktsekretion ab. Beim Einsatz des

erfindungsgemäßen Verfahren liegt daher die maximale Produktbildungsrate bei minimaler Proliferation vor.

Dieser Umstand ist auch über eine reine Produktivitätssteigerung hinaus von Interesse. Durch die Entkopplung von Wachstum und Produktbildung ergeben sich entscheidende Verbesserungen der Verbrauchsraten. Da die Zellen gut produzieren, ohne zu wachsen, ist eine optimale Ausnutzung der eingesetzten Substrate erzielbar.

Patentanspruch

1. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen
dadurch gekennzeichnet, daß deren Wachstums- und
5 Produktionsphase voneinander entkoppelt sind.
2. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet, daß mit abnehmender
spezifischer Wachstumsrate die Produktbildungsrate zunimmt.
10
3. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 oder 2
dadurch gekennzeichnet, daß sie eine maximale
Sekretion spezifische Produkte in der G1-Phase aufweisen.
- 15 4. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 3
dadurch gekennzeichnet, daß sie bei minimaler
spezifischer Wachstumsrate eine maximale Produktbildungsrate
aufweisen.
- 20 5. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet, daß die Abnahme der
spezifischen Wachstumsrate umgekehrt proportional zur Zunahme der
zellspezifischen Produktbildungsrate ist.
- 25 5. Verfahren zur Herstellung von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach
einem der Ansprüche 1 bis 5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß
 - a) ein Inoculum hoher Zelldichte hergestellt wird,
 - b) die Zellen mindestens 24 h konfluent anwachsen und
 - 30 d) nach Bildung einer konfluenten Oberfläche eine Übertragung
genetischen Materials durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6
dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von mindestens 1×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7
dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von 1×10^5 bis 4×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8
dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9
dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 24 bis 72 h konfluent anwachsen.
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10
dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 30 bis 60 h konfluent anwachsen.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11
dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 40 bis 50 h konfluent anwachsen.
- 30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12
dadurch gekennzeichnet, daß die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in immobilisierter Form eingesetzt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13

dadurch gekennzeichnet, daß die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in Wirbelschichtreaktoren eingesetzt werden.

15. Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der
- 5 Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung von Proteinen, vorzugsweise Enzymen.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/06, 5/10, 15/67	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22096 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07606 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1999 (11.10.99) (30) Prioritätsdaten: 198 47 422.9 14. Oktober 1998 (14.10.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Leo-Brandt-Str., D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EISENKRÄTZER, Detlef [DE/DE]; Münchener Str. 5, D-52428 Jülich (DE). DINTER, Andre [CH/CH]; Lindenstr. 459, CH-5628 Birri (CH). KIESEWETER, Andre [DE/DE]; Albert-Schweitzer-Str. 13, D-98528 Suhl (DE). ZENG, Steffen [DE/DE]; Kapellersgutweg 28, D-78462 Konstanz (DE). BISELLI, Manfred [DE/DE]; Max-Hermkes-Platz 8, D-52428 Jülich (DE). BERGER, Eric, G. [CH/CH]; Zum Mühliweiher 4, CH-8165 Schöfflisdorf (CH). (74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Str. 10, D-40878 Ratingen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 13. Juli 2000 (13.07.00)
(54) Title: CHINESE HAMSTER OVARY CELLS FOR PRODUCING PROTEINS (54) Bezeichnung: CHINESE-HAMSTER-OVARY-ZELLEN ZUR PRODUKTION VON PROTEINEN (57) Abstract The invention relates to Chinese hamster ovary cells for producing proteins which are characterized in that the growth phase and production phase thereof are separated from one another. The invention also relates to a method for producing the Chinese hamster ovary cells, and to the use of the Chinese hamster ovary cells for producing proteins. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen, die sich dadurch auszeichnen, daß deren Wachstums- und Produktionsphase voneinander entkoppelt sind. Ferner sind Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sowie die Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Herstellung von Proteinen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .lional Application No

PCT/EP 99/07606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT-MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/67

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 08934 A (GORFIEN STEPHEN F ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US); GRUBER DALE (US); M) 5 March 1998 (1998-03-05) abstract page 43, line 18 - line 26 figure 6 examples 7-12	1-15
X	WO 97 12972 A (UNIV SIENA ;OLIVIERO SALVATORE (IT)) 10 April 1997 (1997-04-10) claims	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2000

Date of mailing of the international search report

09/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAWORSKI P. ET AL.: "SERUM-FREE TRANSFECTION AND SELECTION IN CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS" BIOTECHNIQUES., vol. 15, 1993, pages 863-866, XP000891597 NATICK US the whole document ----	1-15
A	WO 94 00095 A (CORTEX PHARMA INC ;GEORGIA TECH RES INST (US); EVELETH DAVID D JR) 6 January 1994 (1994-01-06) page 19, line 4 - line 15 ----	1-15
A	GOLDSTEIN S. ET AL.: "Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2-M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate" NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 17, 1989, pages 3959-3972, XP002054817 OXFORD, GB the whole document ----	1-15
X	LE GROS G. ET AL.: "The effects of sodium butyrate on lymphokine production" LYMPHOKINE RESEARCH, vol. 4, no. 3, 1985, pages 221-227, XP000901215 page 222, line 1 - line 10 figure 2; table 1 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07606

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9808934 A	05-03-1998	AU 4330597 A EP 0953041 A	19-03-1998 03-11-1999
WO 9712972 A	10-04-1997	AU 7142996 A CA 2230957 A EP 0853668 A NO 981353 A	28-04-1997 10-04-1997 22-07-1998 25-03-1998
WO 9400095 A	06-01-1994	AU 4544993 A CA 2138124 A EP 0650368 A JP 9500087 T	24-01-1994 06-01-1994 03-05-1995 07-01-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. J. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07606

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/67

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 08934 A (GORFIEN STEPHEN F ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US); GRUBER DALE (US); M) 5. März 1998 (1998-03-05) Zusammenfassung Seite 43, Zeile 18 - Zeile 26 Abbildung 6 Beispiele 7-12	1-15
X	WO 97 12972 A (UNIV SIENA ;OLIVIERO SALVATORE (IT)) 10. April 1997 (1997-04-10) claims -/-	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Panzica, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH-ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZAWORSKI P. ET AL.: "SERUM-FREE TRANSFECTION AND SELECTION IN CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS" BIOTECHNIQUES., Bd. 15, 1993, Seiten 863-866, XP000891597 NATICK US das ganze Dokument	1-15
A	WO 94 00095 A (CORTEX PHARMA INC ;GEORGIA TECH RES INST (US); EVELETH DAVID D JR) 6. Januar 1994 (1994-01-06) Seite 19, Zeile 4 - Zeile 15	1-15
A	GOLDSTEIN S. ET AL.: "Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2-M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate" NUCLEIC ACID RESEARCH, Bd. 17, 1989, Seiten 3959-3972, XP002054817 OXFORD, GB das ganze Dokument	1-15
X	LE GROS G. ET AL.: "The effects of sodium butyrate on lymphokine production" LYMPHOKINE RESEARCH, Bd. 4, Nr. 3, 1985, Seiten 221-227, XP000901215 Seite 222, Zeile 1 - Zeile 10 Abbildung 2; Tabelle 1	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07606

Im Recherch nb richt angeführtes Patentdokum nt	Datum der Veröff ntlichung	Mitglied(er) der Patentfamili	Datum der Veröffentlichung
WO 9808934 A	05-03-1998	AU 4330597 A EP 0953041 A	19-03-1998 03-11-1999
WO 9712972 A	10-04-1997	AU 7142996 A CA 2230957 A EP 0853668 A NO 981353 A	28-04-1997 10-04-1997 22-07-1998 25-03-1998
WO 9400095 A	06-01-1994	AU 4544993 A CA 2138124 A EP 0650368 A JP 9500087 T	24-01-1994 06-01-1994 03-05-1995 07-01-1997



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internati nale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/06, 5/10, 15/67	A3	(11) Internati nale Ver"ffentlichungsnummer: WO 00/22096 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07606 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1999 (11.10.99) (30) Prioritätsdaten: 198 47 422.9 14. Oktober 1998 (14.10.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Leo-Brandt-Str., D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EISENKRÄTZER, Detlef [DE/DE]; Münchener Str. 5, D-52428 Jülich (DE). DINTER, Andre [CH/CH]; Lindenstr. 459, CH-5628 Birri (CH). KIESEWETER, Andre [DE/DE]; Albert-Schweitzer-Str. 13, D-98528 Suhl (DE). ZENG, Steffen [DE/DE]; Kapellersgutweg 28, D-78462 Konstanz (DE). BISELLI, Manfred [DE/DE]; Max-Hermkes-Platz 8, D-52428 Jülich (DE). BERGER, Eric, G. [CH/CH]; Zum Mühlweiher 4, CH-8165 Schöfflisdorf (CH). (74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Str. 10, D-40878 Ratingen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 13. Juli 2000 (13.07.00)
(54) Title: CHINESE HAMSTER OVARY CELLS FOR PRODUCING PROTEINS		
(54) Bezeichnung: CHINESE-HAMSTER-OVARY-ZELLEN ZUR PRODUKTION VON PROTEINEN		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to Chinese hamster ovary cells for producing proteins which are characterized in that the growth phase and production phase thereof are separated from one another. The invention also relates to a method for producing the Chinese hamster ovary cells, and to the use of the Chinese hamster ovary cells for producing proteins.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen, die sich dadurch auszeichnen, daß deren Wachstums- und Produktionsphase voneinander entkoppelt sind. Ferner sind Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sowie die Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Herstellung von Proteinen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen, ein Verfahren zur Herstellung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sowie die Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Herstellung von Proteinen, vorzugsweise Enzymen.

10 Der Einsatz von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen ist aus dem Stand der Technik bekannt. Beispielhaft sei hierzu auf Koplove H.M., Ann Hematol 1994; 68(3):15-20 verwiesen. Bei diesen Verfahren werden die Zellen in herkömmlichen Rührfermentern eingesetzt. Eine Verwendung in immobilisierter Form ist bekannt (Zeng S.
15 et al, Biochem Biophys Res Commun 1997; 237 (3):653-658). Jedoch besteht ein Bedarf zur Verbesserung der Ausbeute an spezifischen Proteinen in immobilisierten Zellen.

Die vorliegende Erfindung hat sich demgemäß die Aufgabe gestellt,
20 Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen zur Verfügung zu stellen, die in immobilisierter Form für den Einsatz im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die Wachstums- und
25 Produktionsphase der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen voneinander entkoppelt sind.

Erfindungsgemäß zeichnen sich die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen vorzugsweise dadurch aus, daß die maximale Sekretion der spezifischen
30 Produkte in der G1-Phase erfolgt. G1 bedeutet, daß die Zelle in dieser Phase des Zellzyklus den einfachen Gehalt an Desoxyribonukleinsäuren

(DNA) besitzt. Ferner sind die Zellen vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß mit abnehmender Wachstumsrate die Produktbildungsrate zunimmt, so daß bei minimaler Wachstumsrate eine maximale Produktbildungsrate vorliegt. Erfindungsgemäß ist die zellspezifische Produktbildungsrate bei minimaler Wachstumsgeschwindigkeit mindestens genauso hoch wie die spezifische Produktbildungsrate herkömmlich transfizierter Zellen bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit. Besonders bevorzugt ist ein Anstieg der Produktbildungsrate um mindestens 50% bei einem Rückgang des Wertes für das S/G1-Verhältnis um mindestens 50% vom Maximalwert. D.h., daß die Abnahme der spezifischen Wachstumsrate umgekehrt proportional zur Zunahme der zellspezifischen Produktbildungsrate ist. Mit S wird in diesem Zusammenhang die Phase im Zellzyklus bezeichnet, in der die Verdopplung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgt, bevor die eigentliche Zellteilung durchgeführt wird.

Die erfindungsgemäßen Chinese-Hamster-Ovary-Zellen lassen sich dadurch herstellen, daß

- a) ein Inoculum hoher Zelldichte hergestellt wird,
- b) die Zellen mindestens 24 h konfluent anwachsen und
- c) nach Bildung einer konfluenten Oberfläche eine Übertragung genetischen Materials in diese Zellen durchgeführt wird.

Vorzugsweise kann erfindungsgemäß ein Inoculum mit einer Zelldichte von mindestens 1×10^5 Zellen/cm² hergestellt werden. Besonders bevorzugt sind Zelldichten von 1×10^5 bis 4×10^5 Zellen/cm². Höchst bevorzugt sind Zelldichten von 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen/cm².

Eine Kultur adhärent wachsender Zellen wird dabei als konfluent bezeichnet, wenn zwischen den einzelnen, an eine Oberfläche angehefteten Zellen keine freie, unbesiedelte Oberfläche mehr vorhanden

ist und die Zellen eine geschlossene Schicht auf der Oberfläche ausgebildet haben. Vorzugsweise wachsen die Zellen 24 bis 72 h konfluent an. Besonders bevorzugt sind hierbei Zeiten von 30 bis 60 h. Höchst bevorzugt sind 40 bis 50 h.

5

Erfindungswesentlich ist, daß die Übertragung genetischen Materials erfolgt, nachdem sich eine geschlossene, konfluente Fläche aus Zellen auf der Oberfläche des Trägers gebildet hat, sich die Zellen somit in einem Status der G1-Phase des Zellzyklus befinden. Im Gegensatz dazu erfolgt
10 bei den bisher bekannten Verfahren die Übertragung genetischen Materials in Zellen, die sich in einem Status der S-Phase des Zellzyklus befinden, üblicherweise nachdem sie subkonfluent angewachsen sind.

Die erfindungsgemäßen Wirkungen lassen sich überraschender Weise
15 auch bei Einsatz der erfindungsgemäßen Zellen in Wirbelschichtreaktoren und trotz der dort auftretenden hohen Scherkräfte erreichen. Wesentlich ist hier, daß die Übertragung des genetischen Materials durchgeführt wird, nachdem die Zellen durch die Immobilisierung auf porösem Trägermaterial in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert wurden.

20

Die Übertragung des genetischen Materials kann in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Transformation oder Elektroporation durchgeführt werden. Besonders bevorzugt ist die Übertragung genetischen Materials durch eine Transfektion der Zellen.

25

Im Anschluß an die Übertragung genetischen Materials erfolgt die Auswahl der geeigneten Klone. D.h. in an sich bekannter Weise wird ein Screening durchgeführt, um die optimalen Zellen zu ermitteln und zu züchten. Beispielsweise durch eine Sortierung einzelner, vitaler Zellen in
30 eine Kammer einer Gewebekulturplatte mit Hilfe eines Flowzytometers, anschließender Überprüfung der Produktivität der einzelnen Klone in

einem ELISA-Test und Selektion der besten Klone durch funktionelle Enzymtests.

5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, das Maximum der Expression rekombinanter Genprodukte in die G1-Phase zu verschieben. Im Gegensatz dazu führen herkömmliche Transfektionsverfahren zu einer Expression rekombinanter Proteine in der S-Phase des Zellzyklus. Derartige Zellen weisen bei der Immobilisierung eine stark verminderte Produktivität auf. Hingegen zeichnen sich die erfindungsgemäßen Zellen
10 durch eine demgegenüber wesentlich höhere Produktivität aus. Insbesondere wird überraschend erreicht, daß das Strukturgen eine nicht vorhersehbare Stabilität aufweist, wodurch die erfindungsgemäß hergestellten Zellen zur Produktion im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

15 Erfindungsgemäß lassen sich demgemäß die Zellen in immobilisierter Form in Wirbelschichtreaktoren einsetzen. Insbesondere sind die Zellen zur Herstellung von verschiedenen Proteinen, vorzugsweise von Enzymen geeignet. Ganz besonders können sie zur Herstellung von
20 Glykosyltransferasen verwendet werden.

Im folgenden wird die Anmeldung unter Bezugnahme auf die Beispiele näher erläutert:

25 1. Klassisches Transfektionsverfahren zur Übertragung genetischen Materials:

Bei dem klassischen Transfektionsverfahren wird die Stammlinie Chinese-Hamster-Ovary-K1, ATTC#CLR-9618 zu $0,3 \times 10^6$ Zellen pro $3,5 \text{ cm}^2$ in Rundschaalen in HAM's F12-Medium der Firma GibcoBRL Life
30 Technologies, Gaithersburg, bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden sind die Zellen subkonfluent angewachsen.

Zur Transfektion werden die Zellen einmal in 2 ml Serum-freiem Medium HAM's F12 der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, gewaschen und anschließend mit einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen pro 35-mm Gewebekulturplatte in 0,8 ml Serum-freiem Medium HAM's F12 überführt. In sterilen Reaktionsgefäßen werden in je 100 µl Serum-freiem Medium 10 µl Lipofectamin-Reagenz der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, bzw. 3 µg rekombinante Plasmid-DNA (pProtA/sol-FTIII, Fig. 1), die für eine Glykosyl-Transferase kodiert sowie 1 µg Plasmid-DNA (pSV2neo) der Firma Clontech, Palo Alto, USA, die als Selektionsmarker für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin kodiert gelöst. Beide Lösungen werden zusammengegeben, sanft gemischt und zur Ausbildung der DNA-Liposom-Komplexe bei Raumtemperatur 15 bis 45 Minuten inkubiert. Anschließend werden diese DNA-Liposom-Komplexe in die Zellsuspension überführt und sanft gemischt. Nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C in einem CO₂ Brutschrank werden die Zellen mit 1 ml Medium HAM's F12 mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, überschichtet. Nach 24 Stunden erfolgt ein Austausch des Mediums gegen 1 ml HAM's F12 mit 10 % FCS und 800 µg/ml_{Medium} G418 (= Geneticin der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg) zum Start der Selektion. Dieses Medium wird alle 48 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Ab dem 6. Tag nach der Transfektion wird das zuletzt genannte Medium alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Am 12. Tag sind einzelne Klone auf der Gewebekulturplatte sichtbar, die einzeln mit einer Gilson®-Pipette abgenommen und separat in dem zuletzt genannten Medium kultiviert werden, welches alle 24 Stunden gegen frisches Medium mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird. Ab dem 18. Tag nach der Transfektion wird dieses Medium alle 48 Stunden gegen frisches Medium

ausgetauscht. Am 22. Tag nach der Transfektion erfolgt ein funktioneller Enzymtest zur Überprüfung der Produktivität der einzelnen Klone. Das genaue Versuchsprotokoll wird unter Punkt 3 genauer erläutert.

5 2. Erfindungsgemäßes Verfahren zur Übertragung genetischen

Materials:

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden aus der Stammsammlung ATCC#CLR-9618 Chinese-Hamster-Ovary-K1-Zellen zu $0,6 \times 10^6$ Zellen pro $3,5 \text{ cm}^2$ in Rundschaalen in HAM's F12-Medium der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank kultiviert. Nach 48 Stunden sind die Zellen konfluent angewachsen. In sterilen Reaktionsgefäßen werden in je 100 μl Serum-freiem Medium HAM's F12 der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, 10 μl Lipofectamin-Reagenz der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg verdünnt, sowie 3 μg rekombinante Plasmid-DNA (pProtA/sol-FTIII, Fig. 1), die für eine Glykosyl-Transferase kodiert und 1 μg Plasmid-DNA (pSV2neo) der Firma Clontech, Palo Alto, USA, die als Selektionsmarker für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin kodiert gelöst. Anschließend werden beide Lösungen zur Ausbildung von DNA-Liposom-Komplexen vereinigt, sanft gemischt und 15 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wird das Kulturmedium aus der Rundschaale entfernt, ohne jedoch die Zellen von der Oberfläche abzulösen. Anschließend wird die DNA-Liposomen-Suspension über die adhären-ten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank werden die Zellen zusätzlich mit 1 ml Medium HAM's F12 mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, überschichtet. Nach 6 Tagen erfolgt ein Austausch des Mediums gegen 1 ml HAM's F12 mit 10 % FCS und 800 $\mu\text{g/ml}_{\text{Medium}}$ G418 (= Geneticin der Firma GibcoBRL Life Technologies,

Gaithersburg) zum Start der Selektion. Dieses Medium wird alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Ab dem 15. Tag nach der Übertragung des genetischen Materials in die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen sind einzelne Klone auf der Gewebekulturplatte sichtbar. Mit 1 ml einer gebrauchsfertigen Trypsin/EDTA (Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, werden alle angewachsenen Klone abgeschwemmt und in je einer Rundschale mit je 1 ml Medium HAM's F12 mit 10 % FCS und 800 µg/ml_{Medium} G418 erneut kultiviert.

10 Nach 3 Tagen werden die vitalen Zellen nach dem sogenannten Single-Cell-Sorting im Streulicht eines Flowzytometers (z.B. FACScan[®] der Firma Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) vereinzelt. Je eine Zelle wird in eine Kammer einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen sortiert und anschließend in HAM's F12-Medium mit 10 %

15 FCS und 800 µg/ml_{Medium} G418 kultiviert, wobei das Medium alle 24 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird. Nach weiteren 3 Tagen wird das Medium alle 48 Stunden gegen frisches Medium gleicher Zusammensetzung ausgetauscht. Am 23. Tag nach Übertragung des genetischen Materials

20 in die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen wird zur Überprüfung der Produktivität und Auswahl der besten Klone ein Enzym-gekoppelter immunologischer Test (ELISA; Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) durchgeführt, der ausführlich bei Zeng S. et al, Biochem Biophys Res Commun, 1997, Aug 28; 237(3):653-658 beschrieben wird. Im Anschluß

25 daran werden die so selektierten Klone zur Überprüfung ihrer Produktivität einem funktionellen Enzymtest (s. Punkt 3) unterzogen.

Erklärungen zu 1) und 2):

Eine detaillierte Karte des verwendeten Vektors pProtA/sol-FTIII, der für die humane Alpha-1,3-Fukosyltransferase ohne Membrananker kodiert,

30

ist in Fig. 1 dargestellt. Von dem vorliegenden Strukturgen der Fukosyltransferase-III (Vestweber D., Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, BRD) wurde die transmembrane Domäne abgetrennt und die lösliche Form mit den Aminosäuren 44-361 (accession#X53578) in den Vektor pProtA integriert.

3. Funktioneller Enzymtest zur Bestimmung der Transferase-Aktivität:

Das Prinzip des Nachweises der Transferase-Aktivität beruht darauf, daß radioaktiv markierte Fucose in einer Enzym-katalysierten Reaktion von GDP-Fucose auf den Akzeptor N-Acetyl-Lactosamin (LacNAc, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) übertragen wird. Der freie Akzeptor und das nicht umgesetzte Substrat werden über eine Chromatographie-Säule von dem radioaktiven Produkt getrennt und diese Radioaktivität als Maß für die vorhandene Enzymmenge gemessen.

Zunächst wird das Enzym durch Bindung an IgG-Sepharose angereichert. Dazu werden 1,5 ml des zellfreien Überstandes mit 40 µl Trägermaterial bestehend aus 50% IgG-Sepharose-Kugeln in 0,05% Tween 20/5 mM Tris-HCl pH 7.6 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Trägerkugeln werden diese direkt und quantitativ in den Enzymtest eingesetzt. Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 80 µl beinhaltet neben diesen 40 µl des 50%igen IgG-Sepharose-Trägermaterials zusätzlich 40 µl Reaktionsansatz bestehend aus 40mM Cacodylate-Puffer pH 6,2, 5 mM LacNAc als Akzeptor, 0,1 mM GDP-Fucose als Donor, 1 µl ¹⁴C-GDP-Fucose (50.000 cpm), 10 mM MnCl₂, 5 mM ATP und 10 mM Fucose. Der Testansatz wird unter leichtem Schütteln für 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert und liefert einen Gehalt an eingebauter Radioaktivität zwischen 1000 und 10000 cpm. Der Ansatz wird durch die Zugabe von kaltem Wasser gestoppt, über SepPak-Patronen (Firma Waters) aufgereinigt und anschließend zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt. Die Enzymaktivität berechnet

sich dabei wie folgt: Enzymaktivität[U/l] = (Radioaktivität des Produkts [cpm] / insgesamt eingesetzte Radioaktivität [cpm]) x (Substratmenge [μmol] / Inkubationszeit [min] / Volumen an eingesetztem Kulturüberstand [1,5 ml]).

5

4. Bestimmung der Produktbildungskinetik in Suspensionskultur:

Als Voraussetzung zur Bestimmung der Produktbildungskinetik der Zellen wird eine Stammhaltung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in T75-Gewebskulturflaschen (Greiner; Frickhausen, BRD) betrieben. Aus dieser Stammhaltung werden dann $2-3 \times 10^7$ lebende Zellen als Inoculum entnommen. Zunächst wird dazu das alte Kulturmedium abgenommen und in jede T-Flasche 2,5 ml Trypsin-EDTA der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, gefüllt, umgeschwenkt und nach 1 Minute wieder aus der Flasche abgenommen. Die T-Flaschen werden für 5

10 Minuten im Brutschrank inkubiert, die Zellen anschließend abgeklopft und mit 5 ml bei 37°C vorgewärmtem Medium aus einer 3:1-Mischung von DMEM-HAM's F12 mit Supplementen (GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg) von der Flaschenwand abgespült. Mit 0,1 ml Zellsuspension wird aus jeder Flasche die Zelldichte bestimmt. Nach

20 Berechnung der Zellkonzentration wird das entsprechende Volumen mit $2-3 \times 10^7$ Zellen entnommen, in eine sterile Spinner-Flasche (Techne; Cambridge, GB) überführt und auf 100 ml aufgefüllt. Dies entspricht einer Startzellkonzentration von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen werden in einer 3:1-Mischung aus DMEM und HAM's F12, beide mit einer Osmolarität

25 von 350 mOsmol/kg, kultiviert. Außerdem enthält das Medium als Supplemente essentielle Aminosäuren, Spurenelemente, Vitamine, 6 mg/l Insulin, 6 mg/l Transferrin, 0,1952 mg/l Linolsäure, 0,04636 mg/l Thiolsäure und 1% (v/v) Fötales Kälberserum sowie 5 mmol/l Glutamine und 24 mmol/l Glukose. Die Spinner-Flaschen werden auf einer

30 Rührerplatte bei 60 Upm, einem CO₂-Gehalt von 5% und 37°C inkubiert. Mindestens alle 24 Stunden wird eine Probe von 10 ml steril aus der

Spinner-Flasche entnommen und die Zellen bei 200 g in 10 Minuten abzentrifugiert. Die Produktkonzentration wird im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Das Zellpellet wird in 2 ml frischem und vorinkubiertem Medium (5% CO₂, 37°C) resuspendiert, in ein Falcon-Kulturröhrchen (Greiner; Frickenhausen, BRD) überführt und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten bei 200 g abzentrifugiert und die Produktkonzentration im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Berechnung der zellspezifischen Produktivität erfolgt nach der Gleichung:

10

Produktivität =

$$\frac{\text{Gesamtmenge an sekretiertem Produkt}}{\text{Inkubationszeit} \times \text{Gesamtzellzahl während der Inkubation}}$$

15

Die Zellzyklusverteilung wird mittels Flowzytometer bestimmt. Dazu werden die Zellen in 70 %igem Alkohol resuspendiert und zur Permeabilisierung der Zellmembran über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und 1x10⁶ Zellen in PBS-Puffer der Firma GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, der zusätzlich 400 U/ml RNase (Sigma; Deisenhofen, FRG) und 50 µg/ml Popidiumjodid (Sigma; Deisenhofen, FRG) enthält, resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln werden die Zellen direkt mittels eines FACScan®-

25

Flowcytometers der Firma Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA gemessen. Als Analyse-Programm wurde das Programm Cell-Quest (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) angewendet. Zur Ermittlung der Zellzyklusphasen werden die erhaltenen Histogramme mathematisch mit dem Programm ModFit® (Becton

30

Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) ausgewertet.

5a. Ergebnisse der Standard-Methode:

In Fig. 2 ist für drei Experimente in Suspensionskultur die Produktsekretion in Abhängigkeit von der Proliferation der Zellen dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß bei der Standard-
5 Transfektionsmethode die Produktsekretion mit der Proliferation der Zellen zunimmt. Während der Phase starken Wachstums liegt eine erhöhte Produktsekretion vor.

10

5b. Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Die Charakterisierung der Produktbildung von Zellen, bei denen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren genetisches Material übertragen wurde,
15 ergab eine gegenläufige Tendenz wie in Fig. 3 dargestellt ist. Mit zunehmender Proliferation sank in allen Versuchen die Produktsekretion ab. Beim Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt daher die maximale Produktbildungsrate bei minimaler Proliferation vor. Dieser Umstand ist auch über eine reine Produktivitätssteigerung hinaus
20 von Interesse. Durch die Entkopplung von Wachstum und Produktbildung ergeben sich entscheidende Verbesserungen der Verbrauchsraten. Da die Zellen gut produzieren, ohne zu wachsen, ist eine optimale Ausnutzung der eingesetzten Substrate erzielbar.

Legende zu den Figuren 1-3:

Fig. 1: Karte des verwendeten Vektors pProtA/sol-FTIII

- 5
- AmpR: Ampicillinresistenz für die Produktion der DNA in E.coli
 - SV40: Transkriptionspromotor vom SV40-Virus
 - Globin: kodierende Region für Globin
 - Transin: kodierende Region für Transin als Signalsequenz für die
 - 10 Ausschleusung der Transferase
 - Sol-FTIII: Strukturgen der Fukosyltransferase III ohne Membrananker
 - ProtA: kodierende Region für das Protein A zur erleichterten Aufarbeitung
- 15 Literatur: Sanchez-Lopez R. et al, JBC 1998, 263(24):11892-11899

Fig. 2: Ergebnisse der Standard-Methode

20

Fig. 3: Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens

Patentansprüche

1. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen zur Produktion von Proteinen
dadurch gekennzeichnet, daß deren Wachstums- und
5 Produktionsphase voneinander entkoppelt sind.
2. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet, daß mit abnehmender
spezifischer Wachstumsrate die Produktbildungsrate zunimmt.
10
3. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 oder 2
dadurch gekennzeichnet, daß sie eine maximale
Sekretion spezifische Produkte in der G1-Phase aufweisen.
- 15 4. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 3
dadurch gekennzeichnet, daß sie bei minimaler
spezifischer Wachstumsrate eine maximale Produktbildungsrate
aufweisen.
- 20 5. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet, daß die Abnahme der
spezifischen Wachstumsrate umgekehrt proportional zur Zunahme der
zellspezifischen Produktbildungsrate ist.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach
einem der Ansprüche 1 bis 5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß
 - a) ein Inoculum hoher Zelldichte hergestellt wird,
 - b) die Zellen mindestens 24 h konfluent anwachsen und
 - 30 d) nach Bildung einer konfluenten Oberfläche eine Übertragung
genetischen Materials durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6

dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von mindestens 1×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.

5

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7

dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von 1×10^5 bis 4×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.

10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8

dadurch gekennzeichnet, daß ein Inoculum mit einer Zelldichte von 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen/cm² hergestellt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9

15 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Zellen 24 bis 72 h konfluent anwachsen.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10

20 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Zellen 30 bis 60 h konfluent anwachsen.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11

dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 40 bis 50 h konfluent anwachsen.

25

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12

dadurch gekennzeichnet, daß die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in immobilisierter Form eingesetzt werden.

30 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13

dadurch gekennzeichnet, daß die Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in Wirbelschichtreaktoren eingesetzt werden.

15. Verwendung der Chinese-Hamster-Ovary-Zellen nach einem der
- 5 Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung von Proteinen, vorzugsweise Enzymen.

Figurenbeschreibung

Fig. 1

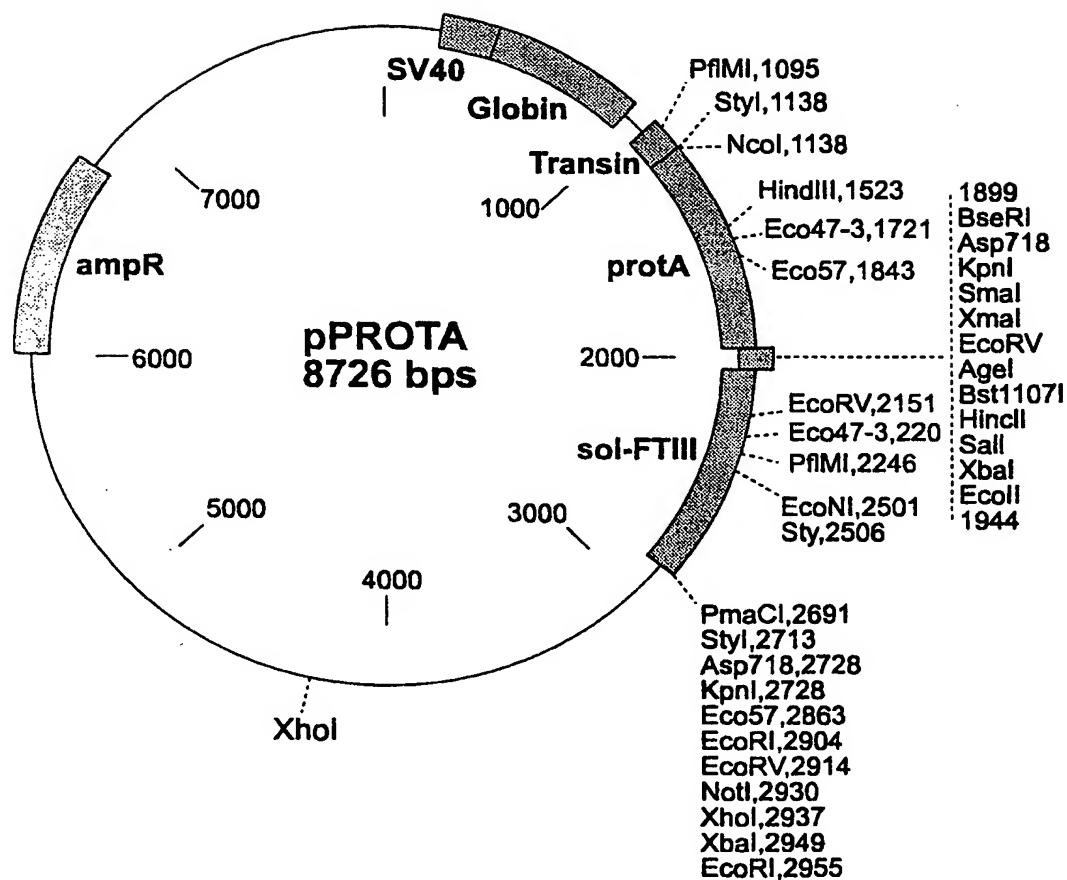


Fig. 2

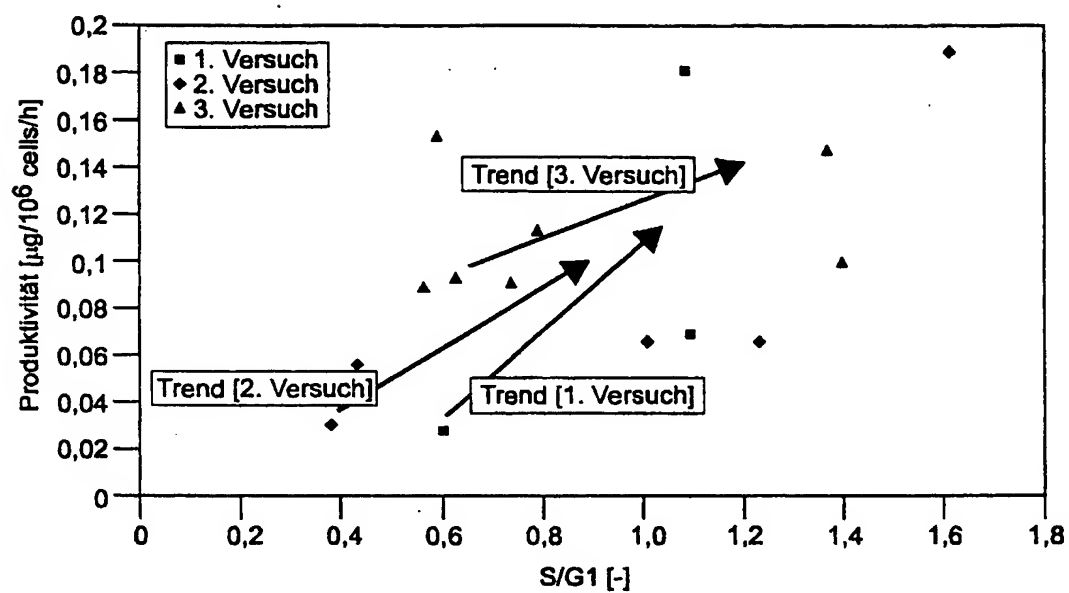
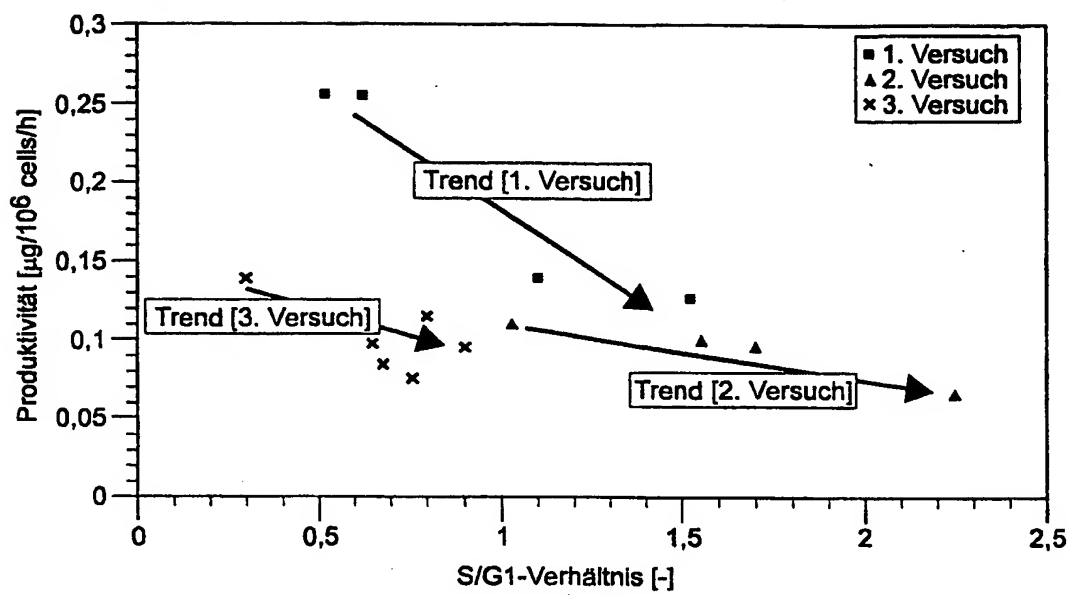


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .lional Application No

PCT/EP 99/07606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT-MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/67

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 08934 A (GORFIEN STEPHEN F ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US); GRUBER DALE (US); M) 5 March 1998 (1998-03-05) abstract page 43, line 18 - line 26 figure 6 examples 7-12	1-15
X	WO 97 12972 A (UNIV SIENA ;OLIVIERO SALVATORE (IT)) 10 April 1997 (1997-04-10) claims	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2000

Date of mailing of the international search report

09/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAWORSKI P. ET AL.: "SERUM-FREE TRANSFECTION AND SELECTION IN CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS" BIOTECHNIQUES., vol. 15, 1993, pages 863-866, XP000891597 NATICK US the whole document ---	1-15
A	WO 94 00095 A (CORTEX PHARMA INC ;GEORGIA TECH RES INST (US); EVELETH DAVID D JR) 6 January 1994 (1994-01-06) page 19, line 4 - line 15 ---	1-15
A	GOLDSTEIN S. ET AL.: "Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2-M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate" NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 17, 1989, pages 3959-3972, XP002054817 OXFORD, GB the whole document ---	1-15
X	LE GROS G. ET AL.: "The effects of sodium butyrate on lymphokine production" LYMPHOKINE RESEARCH, vol. 4, no. 3, 1985, pages 221-227, XP000901215 page 222, line 1 - line 10 figure 2; table 1 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07606

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9808934 A	05-03-1998	AU 4330597 A EP 0953041 A	19-03-1998 03-11-1999
WO 9712972 A	10-04-1997	AU 7142996 A CA 2230957 A EP 0853668 A NO 981353 A	28-04-1997 10-04-1997 22-07-1998 25-03-1998
WO 9400095 A	06-01-1994	AU 4544993 A CA 2138124 A EP 0650368 A JP 9500087 T	24-01-1994 06-01-1994 03-05-1995 07-01-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. J. nales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07606

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/67

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 08934 A (GORFIEN STEPHEN F ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US); GRUBER DALE (US); M) 5. März 1998 (1998-03-05) Zusammenfassung Seite 43, Zeile 18 - Zeile 26 Abbildung 6 Beispiele 7-12	1-15
X	WO 97 12972 A (UNIV SIENA ;OLIVIERO SALVATORE (IT)) 10. April 1997 (1997-04-10) Ansprüche	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Panzica, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH-ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZAWORSKI P. ET AL.: "SERUM-FREE TRANSFECTION AND SELECTION IN CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS" BIOTECHNIQUES., Bd. 15, 1993, Seiten 863-866, XP000891597 NATICK US das ganze Dokument ----	1-15
A	WO 94 00095 A (CORTEX PHARMA INC ;GEORGIA TECH RES INST (US); EVELETH DAVID D JR) 6. Januar 1994 (1994-01-06) Seite 19, Zeile 4 - Zeile 15 ----	1-15
A	GOLDSTEIN S. ET AL.: "Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2-M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate" NUCLEIC ACID RESEARCH, Bd. 17, 1989, Seiten 3959-3972, XP002054817 OXFORD, GB das ganze Dokument ----	1-15
X	LE GROS G. ET AL.: "The effects of sodium butyrate on lymphokine production" LYMPHOKINE RESEARCH, Bd. 4, Nr. 3, 1985, Seiten 221-227, XP000901215 Seite 222, Zeile 1 - Zeile 10 Abbildung 2; Tabelle 1 -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. .ionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07606

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9808934 A	05-03-1998	AU 4330597 A EP 0953041 A	19-03-1998 03-11-1999
WO 9712972 A	10-04-1997	AU 7142996 A CA 2230957 A EP 0853668 A NO 981353 A	28-04-1997 10-04-1997 22-07-1998 25-03-1998
WO 9400095 A	06-01-1994	AU 4544993 A CA 2138124 A EP 0650368 A JP 9500087 T	24-01-1994 06-01-1994 03-05-1995 07-01-1997